

17型コラーゲン産生促進効果を有する PLGA ナノ粒子の新型育毛剤への応用

New Hair Growth Application of the PLGA NP Processing Accelerated Production of Type XVII Collagen

鈴木 貴弘¹, 笹井 愛子¹, 辻本 広行², 安永 峻也³, 小川 法子⁴, 山本 浩充⁵
Takahiro SUZUKI¹, Aiko SASAI¹, Hiroyuki TSUJIMOTO², Toshiya YASUNAGA³,
Noriko OGAWA⁴, Hiromitsu YAMAMOTO⁵

¹ ホソカワミクロン株式会社 マテリアル事業本部 マテリアル事業部 製薬・美容科学研究センター

² 同 マテリアル事業本部長 執行役員

³ 愛知学院大学 薬学部 製剤学講座 助教

⁴ 同 講師

⁵ 同 教授

¹ Pharmaceutical & Beauty Science Center (PBSC), Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

² Operating Officer, Division Director, Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

^{3,4} Assistant professor, School of Pharmacy, Pharmaceutical Engineering, Aichi Gakuin University, JAPAN

⁵ Professor, School of Pharmacy, Pharmaceutical Engineering, Aichi Gakuin University, JAPAN

抄 録

毛包幹細胞は自ら産生した特殊な3Dコラーゲン(17型コラーゲン:COL17)を接着剤のように使い、毛包内壁(バルジ領域)に停留し、そこで発毛を司る毛母細胞を産生している。しかし、加齢に伴いCOL17の産生量は減少し、幹細胞の毛包内壁への接着が低下すると毛周期の進行やターンオーバーに伴って毛包から排出され、薄毛が進行していくことが最近の研究で報告されている。この進行を抑制するためにCOL17を塗布(育毛剤)や経口摂取(サプリメント)で補おうとしても、外部から供給したCOL17を毛包幹細胞が取り込むことはなく、毛包幹細胞をバルジ領域に留まらせるには幹細胞に自らCOL17を産生させることが必要である。著者らはこれまでに有効成分を封入したPLGAナノ粒子の毛穴浸透性や効果持続性、さらには細胞内への成分送達を高めうることを報告してきた。本稿ではPLGAナノ粒子を用いることによる17型コラーゲン産生促進効果、及びそれによる毛包幹細胞の活性向上効果を報告する。

ABSTRACT

It has been known that “loss of hair follicle stem cells due to aging” is one of the factor of thinning hair. In recent years, it became clear that the reduction of a special type collagen (type 17 collagen: COL17) present in the vicinity of hair follicle stem cells was largely involved in the mechanism. However, because it is difficult to directly ingest COL17 by applying hair restorer or taking supplement, it is necessary to promote the production

of COL17 in hair follicle stem cells and nearby cell groups. The problems are permeability and delivery of components into cells.

We have developed poly-lactide-co-glycolide acid nanoparticles (PLGA NP) as a DDS carrier and reported that skin permeability and sustainability of the effect and intracellular of ingredient encapsulated could be enhanced.

In this paper, we report the effectiveness of chlorogenic acid encapsulated PLGA nanoparticles that have effects of promoting the production of COL17 and the activation of hair follicle stem cells.

1 はじめに

男性型脱毛症 (Androgenetic Alopecia: AGA) は「思春期以降に増加する男性ホルモンの影響により、ヘアサイクルの成長期が短縮し、毛包が萎縮することで毛髪の軟毛化が起こる脱毛症」と定義される。男性ホルモンの増加以外にも「血行不良」, 「パーマやカラーリング, 紫外線等の外的刺激による炎症」なども薄毛の原因になるため、現在上市されている育毛剤の多くには「男性ホルモン抑制」や「血行促進」, 「頭皮環境改善 (抗炎症・保湿)」, 「毛乳頭・毛母細胞の賦活」に有効な成分 (育毛成分) などが配合されている。これら育毛成分はその作用機序からも毛穴深部にあって効果を発現するものであり、育毛剤性能は育毛成分の浸透性によって決まると言っても過言ではない。

通常、毛穴には発達した皮脂腺が付随し、角栓や皮脂などが生成されて閉塞されやすい。そのため、育毛成分をアルコールや水に単に溶解させて塗布する従来型の育毛剤では、毛穴深部まで育毛成分を十分に浸透させることは容易ではない。また、仮に成分が毛穴内部に浸透したとしても、毛穴内部の角質層は組織的に極端に粗な構造であるため、育毛成分は速やかに頭皮内へ吸収され、毛穴深部において有効濃度を長時間保持することは難しい。

育毛剤開発では、細胞試験での有効性は示されるものの、実際の使用環境となるヒト試験では期待される効果がなかなか得られないことが多く、本来有効成分が有する性能を引き出すためには「必要な場所 (毛穴深部) に必要な (育毛) 成分を必要なだけ届け続ける」DDS (Drug Delivery System) のコンセプトが重要である。

著者らはこれまでに DDS をコンセプトとする PLGA (乳酸・グリコール酸共重合体) ナノ粒子 (PLGA NP) 技術を開発し、10 年来育毛剤の研究・開発を行っ

てきた^[1]。本報告では最新の育毛理論である「17 型コラーゲン産生促進による薄毛予防」について報告する。

2 毛包幹細胞と 17 型コラーゲン

1990 年に Cotsarelis G. らが提唱した「バルジ (bulge) 領域に存在する毛包幹細胞が毛の発生・成長を司る」^[2] という学説を基に、毛包幹細胞を中心とした様々な研究がおこなわれてきた。これまでの多くの研究から、毛包で産み出され成長した毛髪は最終的に脱落するが、毛包幹細胞と毛母細胞の分化・増殖により新しい毛髪が再び産生される (ヘアサイクル) ことが明らかとなっている。他方、他の幹細胞と同様に加齢によって毛包幹細胞の数が減少することもわかってきた。前述の通り、毛包幹細胞は毛髪の素となる毛母細胞に分化する細胞であるため、毛包幹細胞の減少により毛包のミニチュア化が起こり毛髪の細毛化、脱毛による薄毛が引き起こされる。さらに 2016 年には毛包幹細胞の減少メカニズムに毛包幹細胞の近傍に存在する特殊なコラーゲン (17 型コラーゲン: COL17) が大きく関与していることが明らかとなり^[3]、COL17 は加齢による薄毛に対する予防・治療の観点から育毛業界でも注目を集めている。

COL17 は毛穴内部・バルジ領域近傍に存在する毛包幹細胞に発現している膜貫通性コラーゲンで、毛包幹細胞と基底膜を楔の様に物理的に保持・固定している (図 1)。膜貫通型であるため、多くのコラーゲンと同様に経口や塗布により生体外部から供給してもその機能を発現させることはできず、毛包幹細胞および周辺細胞自身に直接 COL17 を産生させる必要がある。

COL17 産生促進成分はこれまでにいくつか見出されてきているが、図 1 に示す様にバルジ領域は毛

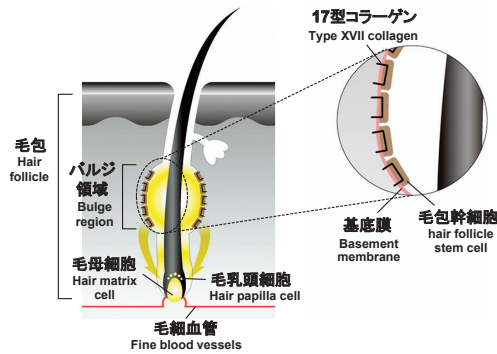


図1 毛髪構造のイメージ図
Fig. 1 Image of hair structure.

穴に存在するため、既存の PLGA NP を用いた育毛剤と同様に、NP による成分の毛穴深部への浸透性と持続性が奏功すると考えた。

本稿では PLGA NP による 17 型コラーゲン産生促進効果^[4]、及びそれによる毛包幹細胞の活性効果を検証した。

3 PLGA ナノ粒子 (PLGA NP)

3.1 PLGA NP の特長

PLGA は乳酸とグリコール酸がエステル結合によってランダムに共重合した単鎖構造をもつ生体適合性ポリマーである。エステル結合部位は水存在下

で加水分解し、最終的には TCA 回路 (Tri-Carboxylic Acid cycle) を経て水と二酸化炭素にまで分解され体外へ排出される (図 2)。そのため、一般的なナノ粒子で懸念される細胞毒性や体内残留性は無く、極めて安心・安全な材料であり化粧品原料としての各種安全性が証明されている^[5] (FDA 認可、医薬部外品・添加剤として承認取得済み)。著者らはこれまでの研究により PLGA NP が封入成分の毛穴浸透性を向上し、粒子からの成分徐放化による効能・効果の持続性を付与し得ること^[6,7] 見出し、育毛剤および各種機能性化粧品開発へと応用してきた^[8,9]。

3.2 PLGA NP の細胞内取り込み能

PLGA NP の細胞内取り込み能は、6-クマリン (蛍光標識剤) 封入 PLGA NP を培地に添加して培養したヒト表皮角化細胞 (NHEK: Normal Human Epidermal Keratinocytes) を、共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany) により観察評価した。

結果、PLGA NP を示す蛍光は 2 h、24 h 後のいずれにおいても観察され、特に 24 h 後では蛍光が細胞全体に観察されたことから PLGA NP は経時的に細胞内に取り込まれ、封入成分を目的の細胞内に送達できることが示唆された (図 3)。

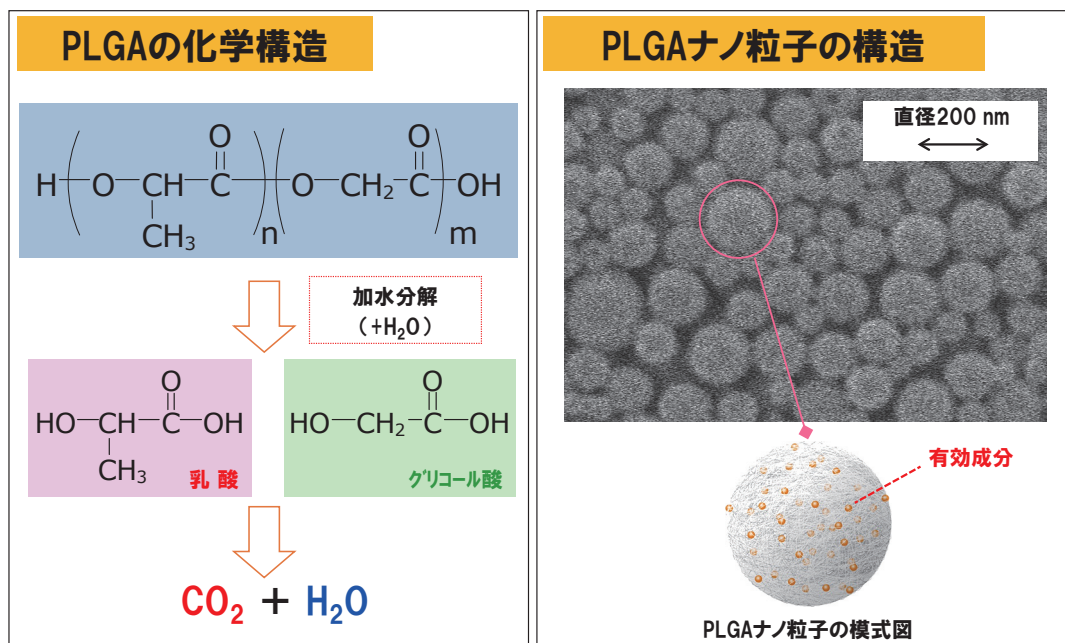


図2 PLGA の化学構造および PLGA ナノ粒子の SEM 写真
Fig. 2 PLGA chemical constitution and SEM image of the PLGA nanoparticles.

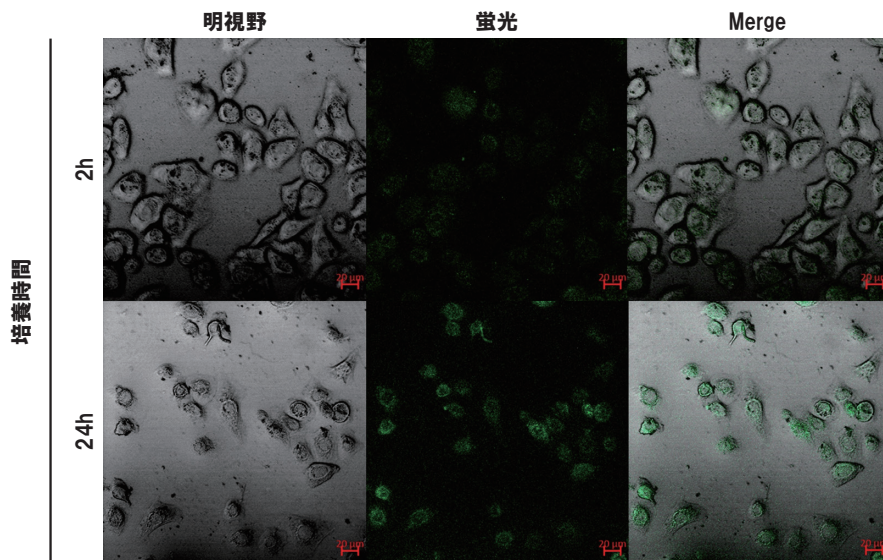


図3 PLGA ナノ粒子の細胞内取り込み

Fig. 3 Fluorescence images of NHEK cells treated with Coumarin/PLGA NP after incubation for 2 h and 24 h. Reproduced with permission^[4]. Copyright: (2020) Elsevier.

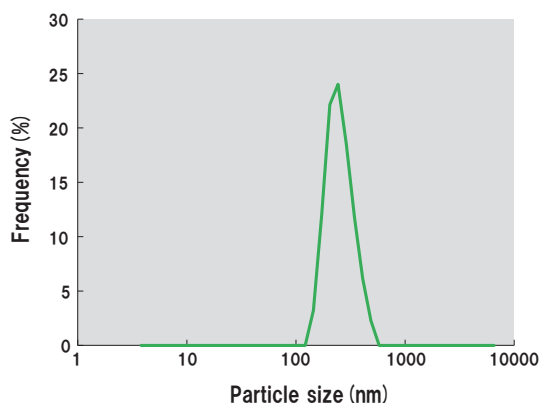


図4 クロロゲン酸封入 PLGA ナノ粒子の粒子径分布

Fig. 4 Particle size distribution of ChA/PLGA NP in water. Reproduced with permission^[4]. Copyright: (2020) Elsevier.

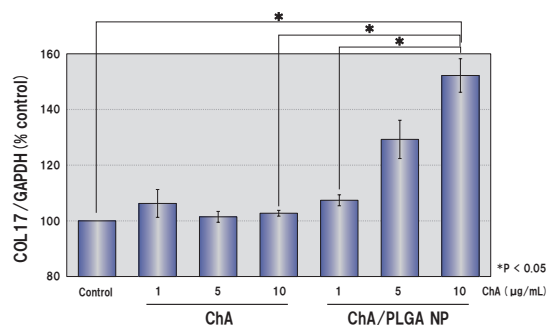


図5 PLGA ナノ粒子による 17 型コラーゲン遺伝子発現効果

Fig. 5 The gene expression of COL17 in NHEK cells by different chlorogenic acid preparation. COL17 activity was measured after incubation for 2 h. Reproduced with permission^[4]. Copyright: (2020) Elsevier.

3.3 17 型コラーゲン遺伝子 (COL17) の発現

リアルタイム PCR 法を用いて PLGA NP による COL17 の発現促進効果を検証した。COL17 産生促進効果の知られるクロロゲン酸 (ChA) を封入した PLGA NP (ChA/PLGA NP, 平均粒子径 224 nm (図 4)) を NHEK に添加し 2 h 暴露した後、通常培地に交換し 22 h 細胞培養した。培養後、細胞から抽出した total RNA をテンプレートとしてリアルタイム PCR を実施した。(目的遺伝子: COL17, リファレンス遺伝子: GAPDH)

ChA 単体群ではコントロールと同程度の遺伝子発

現量となり促進効果は見られなかった(図 5)。他方、ChA/PLGA NP 群では濃度依存的に遺伝子発現量が有意に増加した (Max. 50%)。

PLGA NP の有無で遺伝子発現量に違いがみられた理由について、PLGA NP による ChA の安定化が考えられる。図 6 に示すように、細胞培養環境下 (37°C) において培地中の ChA の検出量は経時的に減少している。これは熱安定性の低い ChA が加水分解によりカフェイン酸とキナ酸に分解したためであると考えられる。これに対し、PLGA NP は封入

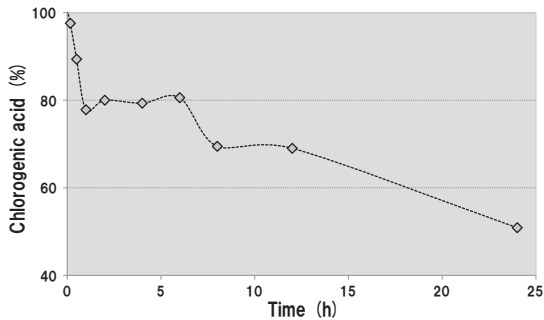


図6 培地中クロロゲン酸量の安定性
Fig. 6 Time course of Chlorogenic acid contained in the medium (%). Reproduced with permission^[4]. Copyright: (2020) Elsevier.

成分の安定化機能を有する^[10]ため、ChAの加水分解を抑制しつつ細胞内に送達することで、COL17の発現を促進できたと考えられた。

3.4 COL17の産生促進

ELISA法を用いてChA/PLGA NPによるCOL17産生効果を検証した。3.3と同様の方法で培養し、細胞に一次抗体(抗COL17抗体)と酵素標識二次抗体を添加し吸光度を測定した。その結果、前項同様、ChA単体群ではコントロールと同程度の発現量となりCOL17の産生促進はされなかったが、ChA/PLGA NP群では濃度依存的にCOL17産生量が有意に増加した(Max. 18%, 図7)。

3.5 毛包幹細胞の活性化

次に、PLGA NP技術による毛包幹細胞の活性向上効果を検証するためにヒト臨床試験を行った(愛知学院大学薬学部臨床研究計画に基づき実施)。PLGA NPへ封入する有効成分は、ChAを主成分とする「ゴボウエキス(株)テクノブル製」とした。被験者6名にPLGA NP配合ローションとプラセボローションをそれぞれ朝晩2回頭皮に塗布し、一定期間後に毛包(バルジ領域含む)を採取した。抗体染色法を用いて、毛包に接着している毛包幹細胞に発現するCD34(幹細胞活性を示すマーカータンパク質)を蛍光顕微鏡(BZ-X800, (株)KEYENCE製, 蛍光写真)により定量評価した。

結果、著効例ではわずか1か月の連用でコントロール群と比較して7倍ものCD34の反応が認められた(図8)。つまり、PLGA NPの毛穴浸透性・作

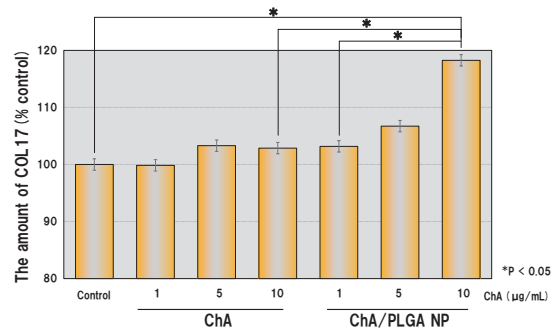


図7 PLGA ナノ粒子による17型コラーゲン産生促進効果
Fig. 7 The amount of COL17 in NHEK cells by different chlorogenic acid preparation. COL17 activity was measured after incubation for 2 h. Reproduced with permission^[4]. Copyright: (2020) Elsevier.

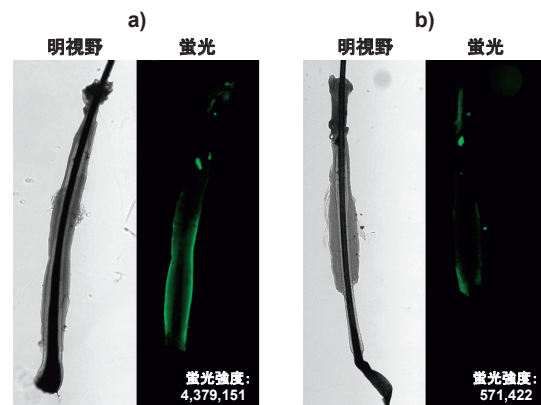


図8 PLGA 製剤連用による毛包幹細胞活性化効果 a) プラセボローション, 1か月連用 b) PLGA NP配合ローション, 1か月連用
Fig. 8 The amount of CD34's fluorescence evaluated by fluorescence antibody technique. a) The hair tonic containing PLGA NP, b) Placebo lotion.

用持続性により、ゴボウエキスがバルジ領域の毛包幹細胞内にまで送達され、COL17の産生とそれに伴う幹細胞活性化を促進したと考えられる。

4 おわりに

今回、PLGA NP技術の有用性をIn vitro系およびin vivo系において示すことができた。なお、昨年上市した育毛剤(ナノインパクト Co17, レディ)はこの最新育毛理論を踏襲したものとなっている。

今後もPLGA NPの確固たるエビデンスに基づいた機能性商品が提案できるよう研究・開発に邁進したい。

References

- [1] Tsujimoto H., Hara K., Tsukada Y., Huang C.C., Kawashima Y., Arakaki M., Okayasu H., Mimura H., Miwa N., Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17 (2007) 4771–4777. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.06.057>
- [2] Cotsarelis G., Sun T.-T., Lavker R.M., Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis, *Cell*, 61 (1990) 1329–1337. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90696-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90696-C)
- [3] Matsumura H., Mohri Y., Binh N.T., Morinaga H., Fukuda M., Ito M., Kurata S., Hoeijmakers J., Nishimura E.K., Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis, *Science*, 351 (2016) aad4395. <https://doi.org/10.1126/science.aad4395>
- [4] Suzuki T., Sasai A., Tsujimoto H., Yasunaga T., Ogawa N., Yamamoto H., Promoting effect of type 17 collagen production by chlorogenic acid using PLGA nanoparticles in the human epidermal keratinocyte cell, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58 (2020) 101624. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101624>
- [5] 川島 嘉明, PLGA ナノスフェアの設計と DDS への展開, *薬剤学*, 66 (2006) 224–238. <https://doi.org/10.14843/jpstj.66.224>
- [6] 辻本 広行, 安武 愛子, 坂東 容平, 三羽 信比古, 川島 嘉明, 化粧品原料としての PLGA ナノ粒子の特徴, *Cosme Tech Japan*, 1 (2011) 77–84.
- [7] 辻本 広行, 原 香織, C.C. Huang, 横山 豊和, 山本 浩充, 竹内 洋文, 川島 嘉明, 赤木 訓香, 三羽 信比古, 球形晶析法で調製した乳酸・グリコール酸共重合体ナノスフェア (PLGA NS) の経皮浸透性評価, *粉体工学会誌*, 41 (2004) 867–875. <https://doi.org/10.4164/sptj.41.867>
- [8] 辻本 広行, 原 香織, 三羽 信比古, 川島 嘉明, PLGA ナノ粒子の育毛剤への応用, *Cosme Tech Japan*, 1 (2011) 79–85.
- [9] 辻本 広行, 坂東 容平, 三羽 信比古, 川島 嘉明, スキンケア技術への応用, *Cosme Tech Japan*, 1 (2011) 43–49.
- [10] Tahara K., Samura S., Tsuji K., Yamamoto H., Tsukada Y., Bando Y., Tsujimoto H., Morishita R., Kawashima Y., Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease, *Biomaterials*, 32 (2011) 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.034>

〈著者紹介〉



鈴木 貴弘 Takahiro SUZUKI

〔経歴〕 2017 年神戸大学大学院工学研究科博士前期課程修了。同年ホソカワミクロン株式会社入社。2017 年から美容科学研究センターにて勤務。

〔専門〕 ナノ粒子のドラッグデリバリーシステム。最近では化粧品開発にも取り組んでいる。

〔連絡先〕 tsuzuki@hmc.hosokawa.com



笹井 愛子 Aiko SASAI

〔経歴〕 2009 年岩手大学大学院博士後期課程修了, 博士 (工学)。同年ホソカワミクロン株式会社入社。2010 年より製薬・美容科学研究センターにて勤務。副センター長。

〔専門〕 ナノマテリアル。PLGA ナノ粒子の医薬品・化粧品開発業務に従事。

〔連絡先〕 ayasutake@hmc.hosokawa.com



辻本 広行 Hiroyuki TSUJIMOTO

〔経歴〕 1988年中央大学大学院理工学研究科博士前期課程修了。博士（工学）。同年ホソカワミクロン株式会社入社。粉体工学研究所，粉体システム事業部等を経て，マテリアル事業本部長，執行役員。

〔専門〕 粉体工学，化粧品，育毛剤開発等 PLGA ナノ粒子の実用化開発の国家プロジェクト等多数。

〔連絡先〕 hysujimoto@hmc.hosokawa.com



安永 峻也 Toshiya YASUNAGA

〔経歴〕 2018年神戸学院大学大学院薬学研究科博士課程単位修得満期退学。同年愛知学院大学薬学部製剤学講座助教。

〔専門〕 医薬品微粒子の乾式コーティングにおける材料合成・装置開発に取り組んでいる。



小川 法子 Noriko OGAWA

〔経歴〕 2005年星薬科大学大学院博士後期課程修了，博士（薬学）。同年星薬科大学助手。同大学助教を経て，2011年より愛知学院大学薬学部製剤学講座にて勤務。講師。

〔専門〕 製剤学，シクロデキストリン化学，ナノ粒子のドラッグデリバリーシステム。



山本 浩充 Hiromitsu YAMAMOTO

〔経歴〕 1994年岐阜薬科大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。博士（薬学）。1995年同大学助手。2006年愛知学院大学薬学部製剤学講座助教授を経て，2012年より同大学教授。現在，同大医療生命薬学研究所 所長。2014年より1年間，ゲーテ大学（ドイツ）博士研究員。

〔専門〕 粉体工学，製剤工学，ドラッグデリバリーシステム。